

FACULTAD DE MEDICINA



# **EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE METALOPROTEASAS SOBRE LA REACCIÓN MICROGLIAL EN UNA LESIÓN MECÁNICA DE LA CORTEZA CEREBRAL DEL RATÓN ADULTO.**

Fermín Rubio Úbeda  
**Curso Académico 2016/2017**

**Tutoras:**

Dra. Noelia Geribaldi Doldán  
Dra. Carmen Castro González





## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer el trabajo realizado a la Dra. Carmen Castro y, en especial, a la Dra. Noelia Geribaldi por su inestimable apoyo, comprensión, trabajo y constancia para hacerme llevar a cabo la meta que nos hemos propuesto emprender, siempre con una motivación constante, aparte de todo el conocimiento que me han transmitido, tanto ellas como el resto del equipo del laboratorio, y la oportunidad de poder ejecutar diversas técnicas experimentales. Como buenas educadoras, han podido conseguir que las cosas difíciles parezcan fáciles, y hacerme guardar lo aprendido como un bello tesoro.

Y es esta gratitud del aprendizaje la que nos lleva a plantearnos que la educación no es una meta fija e inalterable en el tiempo, sino una herramienta para el cambio constante y necesario.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO.....	8
1.2 LESIONES CEREBRALES .....	14
1.3 A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE (ADAM) .....	16
1.4 CÉLULAS DE MICROGLÍA EN LESIONES CEREBRALES.....	18
1.5 PROLIFERACIÓN GLIAL TRAS UN DAÑO TRAUMÁTICO EN EL SNC DE UN RATÓN ADULTO.....	21
1.6 SEÑALES QUE REGULAN LA GLIOGÉNESIS EN LESIONES CEREBRALES .....	23
2. HIPÓTESIS .....	25
3. OBJETIVO .....	25
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL:.....	25
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:.....	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	25
4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	26
4.3 ASPECTOS ÉTICOS .....	26
4.4 LESIÓN EN LA CORTEZA CEREBRAL E IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS: .....	27
4.5 PREPARACIÓN DEL TEJIDO: .....	27
4.6 INMUNOHISTOQUÍMICA:.....	28
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	29
5.1 GRUPOS EXPERIMENTALES .....	29
5.2 MUESTRAS .....	30
5.3 VARIABLES EXPERIMENTALES, GRUPOS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	30
5.4 ANÁLISIS .....	30
5.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	31
6. PLAN DE TRABAJO .....	32
7. RESULTADOS .....	33
8. DISCUSIÓN.....	39

9. CONCLUSIONES .....	43
10. BIBLIOGRAFÍA .....	44

## Resumen

**Fundamento y objetivo:** Las células de microglía son las primeras células que se activan tras una lesión en el Sistema Nervioso Central (SNC). Tras su activación, estas células segregan moléculas proinflamatorias que regulan el comportamiento de las demás células gliales y contribuyen a la generación de un daño hístico secundario que disminuye la supervivencia neuronal. Esta respuesta inflamatoria post-traumática culmina en la generación de una cicatriz glial alrededor de la lesión, cuya función es recuperar la homeostasis normal del tejido, pero previene el recrecimiento axonal y la migración de precursores neuronales al área dañada. En varios estudios se ha demostrado que, tanto la metaloproteasa ADAM17 como el EGFR se sobreexpresan en áreas lesionadas. Esto, junto al incremento de citoquinas proinflamatorias, como TNF $\alpha$ , contribuye a la supervivencia microglial y a la generación de un nicho gliogénico/no neurogénico. En este trabajo hemos estudiado la formación de células microgliales en lesiones mecánicas de la corteza cerebral del ratón adulto en presencia y ausencia de un inhibidor general de metaloproteasas (GM6001).

**Metodología:** Se trata de un estudio experimental en el área de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz. Se lesionaron ratones de la cepa CD1 en la corteza motora primaria y se les implantaron una minibomba osmótica para la infusión local del inhibidor de metaloproteasas GM6001. Los animales fueron inyectados con el análogo de timidina BrdU para evaluar el efecto del inhibidor sobre la proliferación celular local en la lesión. Además, se determinó el número de células BrdU<sup>+</sup>, iba-1<sup>+</sup> y que coexpresan ambos marcadores, tanto en ratones tratados como en el grupo infundido únicamente con vehículo (control).

**Resultados y conclusiones:** La inhibición general de metaloproteasas mediante GM6001 promueve la aparición de células BrdU<sup>+</sup> en la región cortical lesionada, pero no tiene ningún efecto sobre el control de la actividad microglial en lesiones cerebrales ni sobre la proliferación microglial. Estos resultados sugieren que la administración del inhibidor general de metaloproteasas GM6001 incrementa la proliferación en la lesión, fomentando así la regeneración de la zona lesionada sin afectar a la reacción inmunitaria.

**Palabras clave**

Células de microglía, neurogénesis,  $\text{TNF}\alpha$ , receptor del factor de crecimiento epidérmico, metaloproteasas, precursores neurales, ADAM17, células madre neurales, SVZ (zona subventricular).



## Abstract

**Basis and objective:** Microglial cells are the first activated cells after a central nervous system injury. Upon this activation, these cells secrete proinflammatory molecules that regulate the activity of other glial cells and contribute to the generation of secondary tissue damage that decreases neuronal survival. This post-traumatic inflammatory response culminates in the generation of a glial scar around the injury, which has a function in recovering normal tissue homeostasis, but prevents axonal regrowth and neuronal precursors migration towards the damaged area. Several studies have shown that both ADAM17 and EGFR are overexpressed in injured areas. This fact and the increase of proinflammatory cytokines, as TNF, contribute to microglial survival and the generation of a gliogenic/non-neurogenic niche. We have studied whether microglial cells are generated after a mechanical lesion of the cerebral cortex in adult mice in the presence and absence of a general inhibitor of metalloproteinases (GM6001).

**Methodology:** We carried out an experimental study in the Division of Physiology of the Faculty of Medicine at the University of Cádiz. We used 10 adult CD1 mice per experimental group. We injured the cerebral cortex of each mouse and osmotic minipumps were implanted to facilitate release of the metalloprotease inhibitor GM6001. On the last day of treatment, 3 injections of BrdU have been administered and slices have been obtained from the injured area, which has been analyzed by immunohistochemistry. We determined the number of BrdU<sup>+</sup>, iba-1<sup>+</sup> and double labelled BrdU<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup> cells in both treated and control mice.

**Results and conclusions:** We observed that the general inhibition of metalloproteases by GM6001 promotes the new appearance of BrdU<sup>+</sup> cells in the injured cortical area, but it has no effect on the control of microglial activity in brain lesions or on microglia proliferation. Therefore, it is recommended that other signaling pathways or regulatory mechanisms of microglial activity and proliferation in central lesions were studied. These results suggest that the administration of the general inhibitor of metalloproteases (GM6001) increases the proliferation in the lesion area, thus promoting the regeneration of the injured area without affecting the immune reaction.

**Keywords**

Microglial cells, neurogenesis, TNF $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, metalloproteases, neural precursor cells, ADAM17, neural stem cells, SVZ (subventricular zone).

# 1. Introducción

## 1.1 Neurogénesis en el cerebro adulto

La neurogénesis es la producción de neuronas desde las células madre neurales. El correcto balance entre la proliferación de estas células madre y la diferenciación es esencial, tanto para el desarrollo embrionario como para la capacidad regenerativa del cerebro adulto. Existen pocas células madre, y la mayoría se encuentran en estado quiescente, pudiéndose reactivar en los nichos neurogénicos del cerebro adulto y volverse activas para generar nuevas neuronas o células de la estirpe glial. Los mecanismos por los que estas células se vuelven quiescentes o se activan no están claros, pero tiene que haber un equilibrio entre la actividad y la quiescencia de estas células madre para mantener el pool de producción neuronas, pero también para prevenir la proliferación excesiva que llevaría a las células a una senescencia replicativa y tumorigénesis (1).

En el cerebro adulto existen varias regiones neurogénicas en condiciones fisiológicas, de las cuales dos son las más importantes. Estas regiones mantienen una fuente de células madre y progenitores neurales, que son los precursores de todas las estirpes neurales, es decir, tanto de neuronas como de células gliales. Estas zonas son la zona subventricular (SVZ) y el giro dentado del hipocampo (DG) (2).

Los neuroblastos se originan a partir de las células madre neurales en el SVZ y migran por el camino migratorio rostral al bulbo olfatorio, donde se diferencian en interneuronas GABAérgicas. La SVZ también es el lugar de nacimiento de los precursores gliales, existiendo una relativa estabilidad en la generación de nuevas neuronas y células gliales durante la vida del animal (1). En el giro dentado, las células proliferan en la zona subgranular y migran hacia la zona granular para diferenciarse en neuronas funcionales (2).

Las células madre neurales se distribuyen por las paredes laterales de los ventrículos laterales de la SVZ (compuestos por una capa de células endimarias multiciliadas, que

forman una barrera entre en parénquima cerebral y el lumen ventricular) en el cerebro del ratón adulto. Estas células, llamadas células B1, comparten muchas características con los astrocitos (3) y expresan marcadores gliales, como el GFAP, GLAST y BLBP. Además, sus prolongaciones, o pies astrocitarios, recubren las células endoteliales y, mediante sus procesos ciliares apicales, se ponen en contacto con los ventrículos cerebrales. Son los únicos astrocitos que están en contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Estas células pueden estar en un estado de quiescencia o en un estado activo (4). Las formas activas expresan nestina, mientras que las quiescentes, no. Durante el desarrollo y diferenciación de las células madre, pueden cambiar primero a un estado pluripotencial y altamente proliferativo, denominado en inglés “*transit-amplifying cells*”, o precursores neurales (células C). Las células activadas B1 dan lugar a estas células C, que generan neuroblastos (células tipo A), que migran al bulbo olfatorio a través de la vía migratoria rostral (RMS). Estos neuroblastos se mueven, primero, extendiendo sus procesos citoplasmáticos en un cono de crecimiento y translocando posteriormente el cuerpo celular a través de este cono. Este tipo de movimiento se denomina “saltatorio”, en el que participan la expresión tanto de DCX (proteínas asociadas a microtúbulos que participa en la migración neuronal en el periodo embrionario) como de “*collapsing-response mediator protein 4* (CRMP-4) (5), que son proteínas que interactúan con la tubulina y la actina *in vitro* y median la guía de los conos de crecimiento, la polaridad neuronal y la elongación axonal. La interacción específica entre los microtúbulos, la miosina II y la adhesión celular son fundamentales para la migración saltatoria de los neuroblastos de la SVZ. Como se comentará posteriormente, el GABA, además de jugar un papel en la proliferación celular de la SVZ, también interviene en la reducción de la velocidad de la migración de los neuroblastos.

Basado en estudios *in vivo*, las células tipo C se dividen tres veces antes de diferenciarse a células tipo A, las cuales sólo se dividen una, dos o más veces durante su ruta al bulbo olfatorio por el RMS, de la cual migran posteriormente hacia fuera y se diferencian en interneuronas (1).

Las células tipo B1 pueden dar lugar a células del linaje glial, incluyendo a los oligodendrocitos y a los astrocitos. En un cerebro adulto sano, las células B1 generan nuevos oligodendrocitos para el cuerpo calloso, que participan en la reparación de

lesiones en el Sistema Nervioso Central (SNC) (6), mientras que, tras un daño cerebral o una enfermedad desmielinizante, la tasa de producción de oligodendrocitos en la SVZ aumenta, sugiriendo que las células B1 pueden responder a cambios tras un daño o un estado patológico (1). A su vez, un daño cerebral puede inducir también la producción de astrocitos en la SVZ, que migran hacia el lugar de la lesión. Está descrito que la integridad de la barrera endotelial de los ventrículos laterales es fundamental para la función germinal de la SVZ y la neurogénesis por las células B1 (1).

La autorrenovación y diferenciación de las células madre neurales está controlada y determinada por un microambiente especializado, denominado "nicho". Dentro de este nicho, las señales solubles y no solubles son derivadas de las propias células, de sus progenitores o de las células vecinas (1). La neurogénesis en la SVZ está determinada por las señales de este nicho, como pueden ser el FGF-2 y el EGF, que son los principales mitógenos usados para la proliferación de la SVZ *in vitro*, y juega un papel *in vivo*. Se ha descrito que hay receptores para el EGF y el FGF en la SVZ, y que los ratones carentes de receptores para estos ligandos sufren una disminución significativa de la neurogénesis (1).

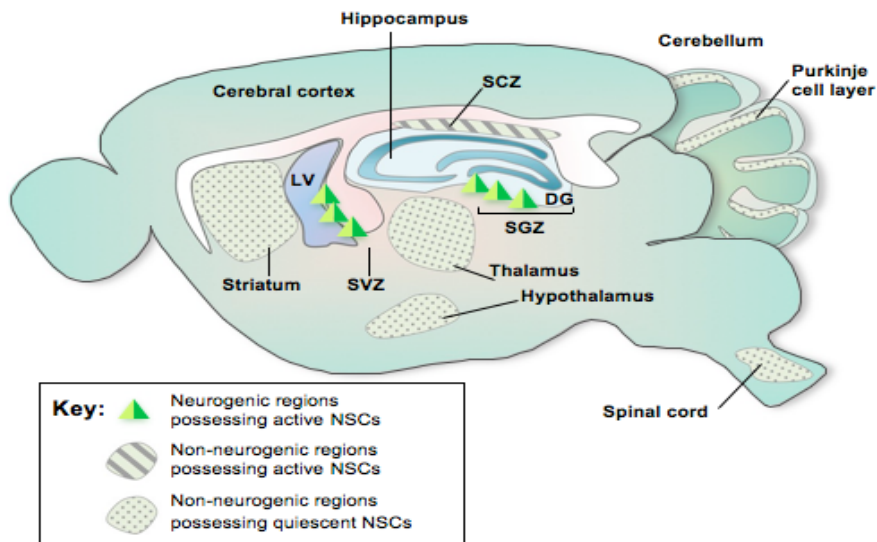
Una familia de morfógenos neurales son los BMPs, que, además, también regulan los nichos germinales en el cerebro del ratón adulto. Esta vía promueve tanto la oligodendrogénesis como la neurogénesis. Las células de la SVZ producen BMPs y sus receptores (7). Noggin es una proteína antagonista de BMP, secretada y expresada por las células endoteliales. Se ha descrito que este antagonismo por el BMP contribuye a la formación de un nicho neurogénico en la SVZ, de forma que la sobreexpresión de Noggin por el epéndimo suprime la gliogénesis local. La sobreexpresión de BMP7 en la SVZ suprime la neurogénesis. Otras señales, como la delección de Smad4 o LPR2, también intervienen en la vía BMP. Este conjunto de señales agonistas y antagonistas sobre la vía BMP balancea y controla los niveles de neurogénesis y gliogénesis desde las células madre neurales de los nichos neurogénicos

Varios neurotransmisores también participan en la regulación de la proliferación en la SVZ y la neurogénesis en el OB. Hay axones supraendoteliales con receptores de serotonina que forman un plexo, conectando a las células endoteliales con las B1. La serotonina

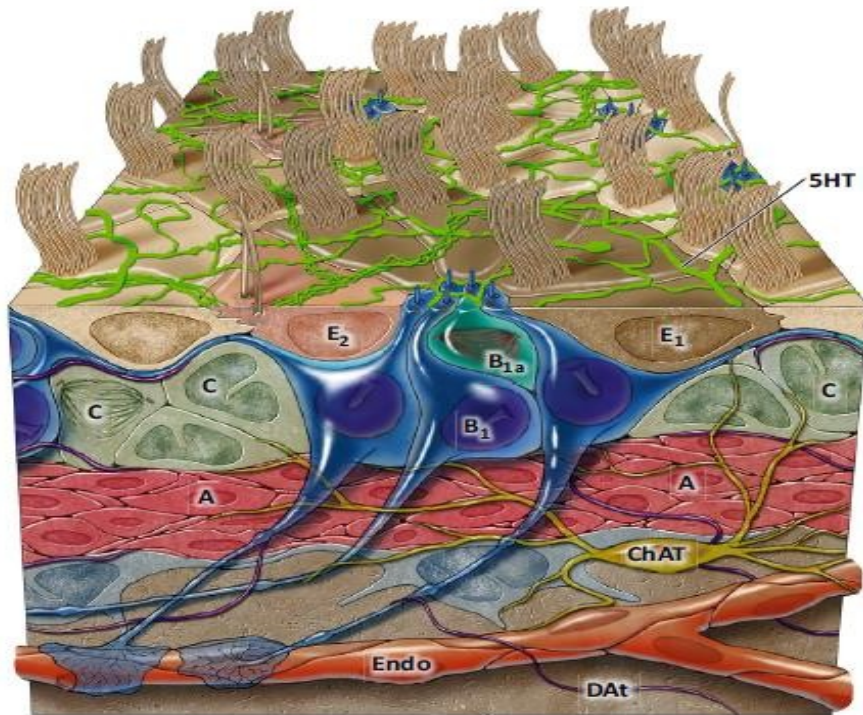
actúa a través de estos receptores en la SVZ regulando la proliferación celular y la neurogénesis en el OB. En la SVZ postnatal se describe una liberación de GABA por los neuroblastos, que activan a los receptores GABA<sub>A</sub> en las células precursoras. La despolarización de los precursores neurales inhibe la proliferación y diferenciación neural (1). Además, las células B1 y C secretan *diazepam-binding-inhibitor protein* (DBI), que inhibe competitivamente a GABA, uniéndose a sus receptores, e incrementando la proliferación y neurogénesis en la SVZ (1).

Las células C son el tipo de células predominantes en la expresión de receptores D2 y D3, que reciben la dopamina desde el mesencéfalo. Se ha descrito que una denervación dopaminérgica disminuye la proliferación en la SVZ y la neurogénesis en el OB, y que la administración de levodopa puede restaurar la proliferación, en estos casos, en la SVZ (8). La inducción de la proliferación por la dopamina está dominada a través del mecanismo del EGF.

Una población de neuronas colin- acetiltransferasa (ChAT) en la SVZ parece que participa en la liberación de acetilcolina y posterior proliferación en esta área cerebral, a través, en parte, de la activación del receptor FGF. De esta forma, parece ser que la integración de la actividad neuronal en los precursores neurales regula la neurogénesis, aunque no se conoce el porqué (1).



**Figura 3. Representación de los nichos neurogénicos y las zonas no neurogénicas en cerebro de ratón adulto.** Existen regiones neurogénicas que poseen NSC activas: en el cerebro adulto, la neurogénesis en la zona subgranular (SGZ) del DG y SVZ del ventrículo lateral suministran activamente células recientemente generadas. SGZ y SVZ se han identificado como regiones neurogénicas espontáneas que poseen NSC autorrenovables y NPC. También se observan regiones no neurogénicas que poseen NSC activos: además de estas dos regiones discretas, la zona subcallosa (SCZ) es la fuente para la generación continua de NSC. Existen regiones no neurogénicas que poseen NSC quiescentes.



**Figura 5. Representación de la SVZ.** Observamos los distintos tipos celulares (A, B1 y C). Las células B1 se relacionan con neuronas acetiltransferasa (ChAT) y terminales de neuronas dopaminérgicas (DA) y serotoninérgicas (5HT), con el líquido cefalorraquídeo producido por las células ependimarias (E1 y E2) de alrededor y con los vasos sanguíneos. Tomado de Lim y Álvarez-Buylla, 2014.





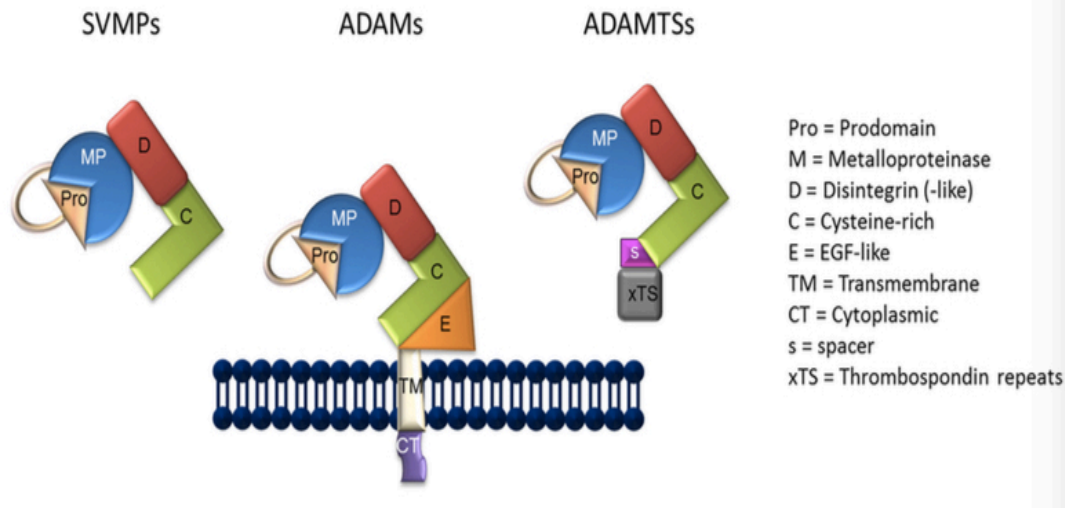
en condiciones de isquemia y que hay un aumento de la neurogénesis en el estriado isquémico, pero no en el neocórtex (9). No obstante, hay estudios que muestran que los mecanismos de reparación pueden recuperar el neocórtex (10), aunque la regeneración cortical tras una lesión isquémica es un tema de controversia. Se han aislado células madre neurales del neocórtex de humanos y ratones, pero se desconoce si estas células tienen el potencial de diferenciarse a neuronas o glía o cómo contribuyen a la neurogénesis tras un daño cerebral (11). Se ha observado que las células madre neurales pueden ser identificadas *in vitro* tres días después de un daño cerebral isquémico, que corresponde a un aumento de la expresión de nestina en el córtex dañado.

Los progenitores neurales pueden que, o sean células quiescentes en el neocórtex, o que migren desde la SVZ a través del cuerpo calloso al activarse tras una lesión. Éstos emergen en el córtex dañado después de una lesión y se diferencian a neuronas inmaduras, pero la mayoría fallan en su desarrollo completo hacia neuronas maduras y sufren una apoptosis. Además, se encontró un aumento de los astrocitos (GFAP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>) en el córtex dañado siete días después de la lesión, debido a la gliosis reactiva característica de las zonas lesionadas. Se plantea entonces que la mayoría de los progenitores neurales pueden diferenciarse a células gliales y que la neurogénesis no es un mecanismo que se encuentre en condiciones fisiológicas en un córtex normal (11). Las lesiones traumáticas en el Sistema Nervioso Central (SNC) van siempre acompañadas de una activación de las células madre presentes en la zona lesionada. Sin embargo, existe una respuesta inflamatoria post-traumática, liderada por una reacción glial, que genera una cicatriz glial alrededor del área dañada y que impide la formación de nuevas neuronas. (12). La cicatriz glial formada consta de varios elementos celulares, incluyendo astrocitos, microglía, oligodendrocitos y fibroblastos (12,13). La función de esta respuesta glial inflamatoria es recuperar la homeostasis normal del tejido, ofrecer resistencia mecánica y proteger al tejido de futuros daños (11,14). No obstante, las células gliales forman una matriz extracelular que previene el recrecimiento axonal y la migración neuronal al área dañada (12,15,16). Algunos mecanismos implicados en esto son la producción excesiva de proteoglicanos por los astrocitos cuando se vuelven reactivos *in vivo* después de lesiones en el SNC. Se ha descrito que los proteoglicanos producidos por esta astrogliá reactiva inhiben el crecimiento axonal y que la región GAG de los condroitín-sulfato-proteoglicanos (CSPG) son inhibitorios para el crecimiento dendrítico

de las neuronas (15). De esta manera, las ventajas y desventajas de la formación de la cicatriz glial se encuentran en discusión y es foco de mira de muchos estudios. En lesiones del SNC, se observa una rápida proliferación de precursores neurales en las áreas neurogénicas, como en la SVZ. Estos precursores neurales migran a través de las fibras de la glía radial al área lesionada, donde, debido a la presencia de un ambiente no neurogénico, se diferencian a células gliales (11). Además, como respuesta al proceso inflamatorio generado por el daño, se producen gran número de células de microglía (17). De este modo, la inhibición farmacológica de la activación microglial constituye una posible diana terapéutica para el tratamiento de las lesiones del SNC, previniendo de esta forma el daño hístico secundario.

### **1.3 A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM)**

Las proteínas de la familia ADAM, originalmente conocidas como MDC (Metalloproteinase/disintegrin/cysteine-rich), pertenecen a la superfamilia Metzincinas de las metaloproteasas. Estructuralmente, contienen un pro-dominio, una metaloproteasa dependiente de Zn, una desintegrina, un dominio rico en cisteína, un dominio EGF-like transmembrana y una cola citoplasmática, que tiene una actividad señalizadora intrínseca y regula la proteólisis (18).



**Figura 7.** Estructura de ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases), ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinases con repeticiones de trombospondina) y SVMPs (snake venom metalloproteinases). Se observa que la familia ADAM contiene un prodominio, que bloquea el sitio catalítico de la enzima y que es eliminado en la maduración y activación de ADAM, un dominio catalítico, o metaloproteasa, una desintegrina, un dominio rico en cisteína, un dominio EGF-like transmembrana, un dominio hidrofóbico transmembrana y una cola C-terminal citoplasmática. Tomado de Nives Giebeler y Paola Zigrino, 2016.

El término “desintegrina” fue tomado para describir al dominio rico en cisteína del veneno de la serpiente, capaz de adherirse a las integrinas e inhibir la agregación plaquetaria, causando hemorragia. De forma similar que las SVMPs, ADAMs se unen a las integrinas, pero por una secuencia rica en ácido aspártico, en vez de por la secuencia amino de las SVMPs. Por esta razón, estos dominios en humanos se denominan “*disintegrin-like*”. El prodominio es eliminado en la maduración de la proteína (18).

En 1994 se descubrió una metaloproteasa implicada en el procesamiento del  $\text{TNF}\alpha$ : ADAM17. Fue descrita como una metaloproteasa que liberaba el precursor del  $\text{TNF}\alpha$  a una forma soluble, ganándose esta enzima el nombre de TACE (*TNF alpha converting enzyme*). Además, las ADAMs están implicadas en el procesamiento y liberación de seis de los ligandos conocidos para el EGFR, que son el  $\text{TGF}\alpha$ , EGF, HB-EGF, betacelulina,

epiregulina y anfiregulina (18).

Recientemente, se ha descrito que la vía ADAM17-TGF $\alpha$ -EGFR promueve la diferenciación glial *in vitro* y está activada en lesiones mecánicas cerebrales, en las que desempeña un papel gliogénico/no- neurogénico (19).

Los hallazgos *in vitro* más relevantes que demuestran este hecho han sido que, al cultivar precursores neurales en condiciones de diferenciación y en ausencia de factores de crecimiento, se produce una diferenciación hacia la estirpe glial. Sin embargo, cuando se añade un inhibidor de la actividad tirosín-quinasa del EGFR, disminuye la diferenciación glial y aumenta el número de neuroblastos. Esto explica que la activación del EGFR mediante un ligando endógeno producido por las mismas células tenía un efecto gliogénico y que esos ligandos del EGFR tendrían que ser escindidos por alguna metaloproteasa endógena (por el papel conocido de estas previamente). Por consiguiente, cuando añadimos un inhibidor de metaloproteasas al medio de cultivo (GM6001), se inhibe la diferenciación glial e incrementa la neuronal. Además, la adición de ambos inhibidores simultáneamente producía el mismo efecto que si se administraban por separado, por lo que compartía un mecanismo de acción común. Por tanto, en condiciones basales de cultivo, el EGFR se activa por los ligandos endógenos liberados por la acción de ADAMs. Otro hallazgo importante fue que, tanto ADAM10 como ADAM17 estaban expresadas en los precursores neurales en cultivo, y que el bloqueo selectivo de ADAM17 por ARNs interferentes específicos, pero no de ADAM10, inhibía la diferenciación glial y favorecía la diferenciación hacia neuronas (19).

En estudios *in vivo* se observó que tras realizar lesiones mecánicas en la corteza cerebral de ratones adultos, se inducía en el tejido la sobreexpresión de ADAM17, de EGFR y de su ligando, TGF $\alpha$  (19). Todo indica que estas señales participaban en la generación de un nicho gliogénico-no neurogénico.

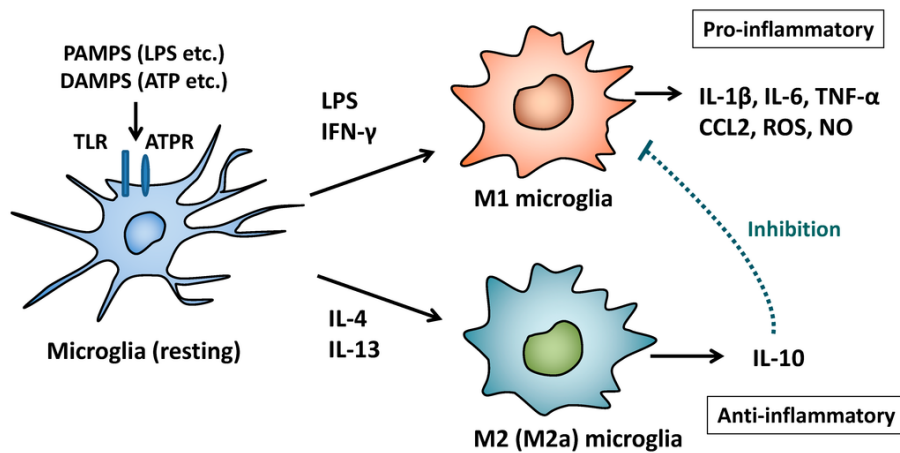
#### **1.4 Células de microglía en lesiones cerebrales**

La microglía, o células de Hortege, son los macrófagos residentes del sistema nervioso central y son las primeras células que reaccionan ante una lesión mediante modificación morfológica, migración al área dañada, proliferación, liberación de citoquinas, fagocitosis de restos celulares y de elementos tóxicos y secreción de factores tróficos, además de

intervenir en la respuesta inmune celular temprana de la inflamación (20,21). Se reconocen dos fenotipos de microglía: una forma inactiva, con numerosas arborizaciones y un soma pequeño, denominada microglía en reposo, y una forma activa ameboide con función fagocítica. En realidad, la microglía en estado inactivo no está en “reposo”, ya que son capaces de reconocer ligeras variaciones en el microambiente local por medio de sus procesos celulares y responder a ellas. Estas células se activan ante un cambio homeostático o ante señales indicativas de daño cerebral, adquiriendo una forma ameboide típica, parecida a la de los macrófagos tisulares. Además, tienen la capacidad de segregar moléculas pro-inflamatorias que regulan el comportamiento de las células de la glía y contribuyen a la generación de un daño hístico secundario que disminuye la supervivencia neuronal (21).

En el mismo tejido dañado, pueden observarse dos fenotipos de microglía activada: una forma inflamatoria y neurotóxica, conocida como M1, y una forma neuroprotectora y antiinflamatoria (M2) involucrada en la resolución de la inflamación, fagocitosis de restos celulares y reparación tisular (20). El primer fenotipo puede ser inducido por la exposición a lipopolisacáridos bacterianos,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , neuronas necróticas, oligómeros de  $A\beta$  y  $\alpha$ -sinucleína que, en conjunto, activan a la proteína kinasa MAPK, aumentan la expresión de MHCII en la superficie celular y estimulan la secreción de citoquinas proinflamatorias por estas células, como  $TNF-\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12 y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Por otro lado, el fenotipo M2 es neuroprotector y es inducido por las citoquinas IL-4 e IL-13, secretadas *in vivo* por los linfocitos Th2. Esto se caracteriza por la expresión de Ym1 (hepatin-binding lectin), FIZZ-1 y arginasa 1 por la microglía. Se ha demostrado *in vitro* que la IL-4 aumenta la actividad fagocítica de la microglía y disminuye la actividad de la iNOS, de la superóxido dismutasa y la producción de  $TNF-\alpha$ , con el posible rescate de las neuronas de la neurotoxicidad (21).



**Figura 8: Estados activos y no activos de las células microgliales.** La microglía en reposo, con morfología dendrítica, es capaz de reconocer ligeras variaciones en el microambiente local por medio de sus procesos celulares y responder a ellas, como pueden ser restos de neuronas necróticas, LPS, INF-gamma o cualquier cambio homeostático o señal indicativa de daño cerebral, adquiriendo un fenotipo ameboide, denominado M1, que participa en la respuesta proinflamatoria. Este cambio fenotípico, que microscópicamente se caracteriza por la expresión de lamellipodium y filopodios, parece esencial para la migración y fagocitosis de restos tisulares por parte de la microglía. En este fenotipo, el conjunto de señales indicativas de daño tisular participan en la activación de la MAPK, que aumenta la expresión de MHC-II en la superficie celular y la secreción de citoquinas proinflamatorias, como puede ser el TNF $\alpha$  y la producción de ROS, contribuyendo a un daño tisular de forma directa e indirecta. El fenotipo M2, en cambio, es neuroprotector y es inducido por las citoquinas IL-4 e IL-13, secretadas por los linfocitos Th2. Esto se caracteriza por la expresión de Ym1 (hepatin-binding lectin), FIZZ-1 y arginasa 1 por la microglía. Estas células son capaces de liberar IL-10, disminuyendo en la microglía M1 la producción de iNOS y la producción de TNF-  $\alpha$ , con el posible rescate de las neuronas de la neurotoxicidad.

Muchos estudios han demostrado que hay un incremento de citoquinas proinflamatorias (como TNF $\alpha$ ) en las horas que siguen al trauma (22). El TNF $\alpha$  se sintetiza como una proteína transmembrana tipo II (pro-TNF- $\alpha$  o mTNF- $\alpha$ ), que se libera en su forma soluble después de sufrir una proteólisis en su porción transmembrana por ADAM17, también denominada TACE (tumor necrosis alpha converting enzyme) (18,22). Se ha descrito que

el mTNF $\alpha$  disminuye la inflamación, mientras que su forma soluble promueve respuestas inflamatorias. Una vez liberada de su porción transmembrana, la acción del TNF $\alpha$  está mediada por medio de dos tipos de receptores: los TNFR1 y los TNFR2 (20). La estimulación de estos receptores por el TNF $\alpha$  promueve la actividad microglial fagocítica. Esto se ha demostrado por la reducción de la activación microglial en lesiones nerviosas del SNC de ratones transgénicos deficientes en receptores del TNF $\alpha$ . Además de la activación microglial, el aumento de TNF $\alpha$  está ligado a apoptosis neuronal, aumento de la permeabilidad vascular y disminución del metabolismo del glutamato (20).

### **1.5 Proliferación glial tras un daño traumático en el SNC de un ratón adulto**

Cuando se produce un daño cerebral traumático, se desencadena una respuesta inflamatoria caracterizada por gliosis, proliferación celular y muerte celular en la zona pericontusional (11). Se ha estudiado la respuesta proliferativa que se origina tras un daño cerebral traumático analizando el fenotipo de las células en división en distintos tiempos post-lesión. Los estudios realizados sugieren que:

1. Existe una proliferación celular que corresponde temporal y espacialmente con un daño traumático en la corteza cerebral.

Se demostró que hay un aumento de las células BrdU<sup>+</sup> en la zona pericontusional y en las zonas cerebrales ipsilaterales de la zona lesionada (paredes de los ventrículos laterales, cuerpo calloso, hipocampo y córtex cerebral). Ya el primer día tras el daño traumático se detectan células BrdU<sup>+</sup> en la zona pericontusional, con un pico máximo en los 3 días posteriores a la lesión. (11).

2. La microglía activada es la población celular más proliferativa en los 3 días posteriores a la lesión.

Además, se observó que ya hay un cambio fenotípico en la microglía desde la forma ramificada quiescente a la activada en el primer día post-lesión, con morfología ameboide, parecida a la de los macrófagos. Esto se traduce en un aumento de los marcadores BrdU<sup>+</sup>/iba-1<sup>+</sup>, con un pico máximo a los 3 días post-lesión en la zona perilesional. Para detectar si en ese instante otras células mieloides pudieran estar proliferando en esa área, se puede emplear el marcador CD11b. Los estudios demuestran



que no se detectan muchas células BrdU<sup>+</sup>/CD11b-1<sup>+</sup> que fueran también Iba-1<sup>+</sup>, sugiriendo que no había mucha más proliferación mieloide aparte de la proliferación microglial en el área lesionada. Se puede emplear también el marcador mieloperoxidasa para determinar si estas células de estirpe mieloide pudieran ser neutrófilos, aunque por lo general, los resultados suelen ser negativos(11).

3. Se observa también, un aumento de la proliferación astrocitaria después de un daño cerebral traumático.

Posteriormente a la formación de la lesión las células más abundantes suelen ser BrdU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>.(11).

4. Existen neuroblastos proliferantes a los tres días post-lesión, que son apenas detectables y no perseveran en el tiempo (11).

5. Las células marcadas NG2, son las más proliferativas a las 24 horas post-lesión. Ya el primer día, el 47% de las células BrdU<sup>+</sup> suelen ser NG2<sup>+</sup>, disminuyendo hasta un cuarto de su valor a los 7 días post-lesión (11).

Todos estos puntos sugieren que los daños traumáticos en el SNC van acompañados de una respuesta rápida, que favorece la formación de astrocitos, microglía y células precursoras de oligodendrocitos (OPC) y compromete la formación de neuroblastos y neuronas.

Mientras el patrón de proliferación es similar tanto para la microglía como para la macroglía, el tiempo y la proporción de células que se activan varía en cada tipo celular. Los NG2, que marcan los OPC, son las células proliferativas más predominantes de forma temprana, mientras que los Iba-1 son más predominantes posteriormente. Después del daño, se ha demostrado que estas células NG2 proliferan rápidamente y se diferencian a oligodendrocitos para reemplazar a los oligodendrocitos perdidos tras el daño cerebral, aunque este tipo de células marcadas también pueden diferenciarse a astrocitos e incluso a neuronas.

## 1.6 Señales que regulan la gliogénesis en lesiones cerebrales

Existen señales que determinan la respuesta gliogénica en las lesiones: el EGFR, o ErbB1, es uno de los 4 miembros de la familia ErbB de receptores tirosina kinasa transmembrana. La vía de señalización fundamental en la activación del EGFR incluye a la vía Ras-Raf-mitogen-activated protein (MAPK). La señal mediada por esta vía estimula la proliferación, diferenciación y supervivencia celular e inhibe la apoptosis (22), además de estimular la producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  por la microglía (22). Se ha demostrado que las mutaciones en el EGFR están relacionadas con la aparición de tumores de epiteliales y gliales en el SNC (23) y son estas mismas células las que resultan afectadas en ratones deficientes de EGFR. En la activación de este receptor participan múltiples ligandos, como son TGF $\alpha$ , EGF, HB-EGF, betacelulina, epiregulina, anfiregulina y epigen. Todos estos ligandos permanecen anclados en la membrana celular mediante su porción transmembrana hasta que la proteína ADAM17, de la familia ADAM (a disintegrin and metalloprotease), rompe proteolíticamente este enlace, liberándose en formas solubles biológicamente activas (19,24). En el SNC, el EGFR se localiza en neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y microglía. En la microglía, además de inhibir la apoptosis, media la migración quimiocinética y quimiotáctica microglial inducida por EGF (25).

Se ha descrito que, tanto ADAM17 como el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) se sobreexpresan en regiones cerebrales lesionadas y que la activación del EGFR favorece la proliferación de precursores neurales en la SVZ, tanto *in vitro* como *in vivo*, pero las células estimuladas se diferencian hacia el linaje glial, a expensas del neural. En estudios *in vitro* e *in vivo* se observa que, tras la inhibición de esta vía, empleando un inhibidor general de metaloproteasas (GM6001), se logra incrementar el número de neuroblastos generados en cultivos de precursores neurales obtenidos de la Zona Subventricular (SVZ), así como también en lesiones experimentales de la corteza motora de ratones adultos (19).

En lesiones de la médula espinal, hay un aumento de la expresión de ADAM17 en las áreas dañadas y, tras inhibir a esta proteína con un inhibidor de metaloproteasas, denominado TAPI-2, se consigue aumentar de forma significativa la apoptosis de microglía y oligodendrocitos. Esta afectación de la viabilidad de oligodendrocitos y

microglía se consigue de forma dosis y tiempo-dependiente, y es resultado del aumento de expresión de caspasa 3 por la inhibición de ADAM17. Se observó, a su vez, que la supervivencia celular dependiente de ADAM17 requería de la activación de EGFR/MAPK por los ligandos que éste escinde de la superficie celular (26). Estos datos apoyan que la inhibición de ADAM17 podría ser clave para el tratamiento de lesiones del SNC, favoreciendo la regeneración neuronal y disminuyendo la respuesta glial.

Otras señales que regulan la actividad microglial son las señales neuronales, como las neurotrofinas, como el NGF, que controla la expresión del MHC-II, actuando a nivel del receptor p75 de neurotrofina. La secreción neuronal de CD22 inhibe la liberación microglial de citoquinas proinflamatorias mediante la activación del receptor CD45 microglial y la expresión de CD200, que puede ser importante para el control de la liberación de TNF $\alpha$  por estas células gliales (21). La microglía también posee receptores para neurotransmisores, de forma que la liberación de neurotransmisores por las neuronas puede contribuir al control microglial en condiciones fisiológicas (21). Estos datos reflejan la necesidad de controlar la función inmune e inflamatoria de la microglía en condiciones fisiológicas para mantener una integridad y equilibrio en los circuitos del SNC.

En nuestro laboratorio, enfocamos nuestros esfuerzos en el estudio de la regeneración de lesiones cerebrales. Estudios previos demostraron que la inhibición de metaloproteasas con el inhibidor general GM6001 incrementa la proliferación celular en el área dañada y que, además, estas células proliferantes se decantan por la estirpe neuronal a expensas de la estirpe glial. Este trabajo está enfocado en el estudio del efecto de este agente inhibidor infundido durante 14 días posteriores a la lesión, sobre las células microgliales en lesiones mecánicas de la corteza motora.

## **2. Hipótesis**

La inhibición de metaloproteasas mediante un inhibidor general (GM6001) altera la formación de células microgliales en regiones lesionadas del cerebro adulto de ratón

## **3. Objetivo**

### **3.1 Objetivo principal:**

Estudiar la formación de células microgliales en lesiones mecánicas de la corteza cerebral en presencia y ausencia de un inhibidor general de metaloproteasas (GM6001) en ratones adultos tratados durante 14 días.

### **3.2 Objetivos secundarios:**

- a. Cuantificación del número de células proliferantes (BrdU<sup>+</sup>). Se comparará el número de células BrdU<sup>+</sup> del área lesionada en ratones tratados con GM6001 y en el grupo control.
- b. Cuantificación del número de microglías (Iba1<sup>+</sup>). Se comparará el número de células Iba1<sup>+</sup> del área de la lesión en ratones tratados con GM6001 y en el grupo control.
- c. Cuantificar el número de microglía proliferante (BrdU<sup>+</sup> /Iba1<sup>+</sup>). Se comparará el número de células BrdU<sup>+</sup> /Iba1<sup>+</sup> del área de la lesión en ratones tratados con GM6001 y en el grupo control.

## **4. Material y métodos**

### **4.1 Diseño del estudio**

Se efectuó un estudio de diseño experimental con ratones en el Servicio Central de Experimentación y Producción animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz y en el área de fisiología de la Facultad de Medicina.

#### **4.2 Animales de experimentación**

Se emplearon 10 ratones adultos por grupo experimental de la cepa CD1, suministrados por el animalario de la universidad de Cádiz, donde se realizaron todas las intervenciones quirúrgicas anteriores al sacrificio. Los animales se colocaron en jaulas individuales con pienso y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12h de luz, a una temperatura de 21°C.

#### **4.3 Aspectos éticos**

La experimentación que se propone en este proyecto implica el uso de animales de experimentación. Los protocolos establecidos para el uso de animales de experimentación están recogidos en el Artículo 20.2 del Decreto 65/2012 de 13 de marzo por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales y Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Para la realización de este proyecto, se ha diseñado una estrategia experimental acorde con la regulación recogida en el Real Decreto 53/2013 y se han tomado unas medidas básicas.

Los animales que se emplearon son ratones CD1 criados para fines experimentales en el Servicio Central de Experimentación y Producción Animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz por criadores acreditados.

Considerando la necesidad de la experimentación e investigación animal para el progreso científico, asumimos que no es motivo suficiente para justificar cualquier tipo de experimento. En este sentido, el número de animales empleados en cada grupo se ajustará para que la “n” final sea la más pequeña posible. Así mismo, todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo un estricto seguimiento de “no dolor”, que continuó en el postoperatorio. Únicamente no se actuó sobre el estrés causado por su individualización en la estabulación tras el acto quirúrgico. Sí se realizaron maniobras diarias de “*handling*”, que reducen o anulan el estrés por manipulación y administración de los tratamientos. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en las instalaciones del SEPA.

La actuación sobre los animales la realizaron investigadores capacitados y acreditados conforme a la normativa vigente.

Al ser un proyecto encuadrado en el tipo II de los establecidos en el Real Decreto 53/2013, se ha obtenido previamente la aprobación al Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEAA) de la UCA y de la Junta de Andalucía.

#### **4.4 Lesión en la corteza cerebral e implantación de minibombas osmóticas:**

Los ratones adultos se anestesiaron con una combinación de ketamina (100 mg/kg) (Imalgene® 500, Merial) y Xylazina (10 mg/kg) (Rompún® 2%, Bayer). Posteriormente, se colocaron en el aparato estereotáxico, asegurados por barras en las orejas y con los incisivos inmovilizados. Se les realizó una incisión cutánea antero-posterior a lo largo de la línea media, dejando el cráneo visible. Una vez apartado el periostio, se tomó bregma como punto de referencia. Se les practicó una craneotomía 1,4 milímetros anterior y 1,5 milímetros lateral derecha a bregma. La corteza motora primaria se lesionó introduciendo una broca de 0,7 milímetros de diámetro hasta una profundidad de 1 milímetro. A los ratones lesionados se les implantaron unas mini-bombas osmóticas de Alzet (Charles River, Barcelona, España) de forma subcutánea, conectándolas con cánulas de infusión (Brain Kit II, Alzet), a una longitud de 0.5 mm dentro de la lesión. Estas bombas infundirían 0.25 µl/hora de GM6001 (50 µM) o únicamente vehículo. Posteriormente, se cerró la herida con cemento quirúrgico y se suturó. Los animales se colocaron individualmente en las condiciones establecidas anteriormente.

#### **4.5 Administración de BrdU**

Se realizaron 3 inyecciones de bromodesoxiuridina intraperitoneal (BrdU, 100 mg/Kg) el día final del tratamiento (en intervalos de dos horas). El BrdU es un nucleótido sintético similar a la timidina que se incorpora al ADN de las células que se están dividiendo en ese momento o al ADN de las que se han dividido recientemente.

#### **4.5 Preparación del tejido:**

Los ratones fueron sacrificados 2 horas después de la última administración de BrdU. Se anestesiaron profundamente con Dolethal (120 mg/Kg), de la casa comercial Vétoquinol, y se perfundieron con paraformaldehído (PFA) al 4%. Los cerebros se postfijaron y crioprotegieron con sacarosa al 30%. Posteriormente, se procedió a la realización de

cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor con un criostato y se conservaron en tampón fosfato salino (PBS) y Glicerol (1:1) a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.6 Inmunohistoquímica:**

Los cortes se lavaron con PBS para eliminar restos de glicerol y, a continuación, se incubaron con tampón citrato (SSC 2X) y formamida (1:1, S/S) durante 2 horas. De esta forma, el tejido permite el paso a los anticuerpos que deben atravesar las membranas, ya que el anticuerpo anti-BrdU debe penetrar en el núcleo.

Posteriormente, se lavaron con SSC 2X durante 15 minutos y se incubaron en ácido clorhídrico (HCL, 2N) durante media hora. Tras ello, se lavaron en tampón borato, de pH 8,4, para neutralizar la carga ácida de la solución anterior. Se volvieron a lavar con PBS y, finalmente, se incubaron en una solución de saturación con PBS, albúmina sérica bovina (BSA) al 2,5% y Tritón X 100 (Tx 100) al 0,1% durante una hora, favoreciendo la especificidad de los anticuerpos que íbamos a utilizar.

Se procedió finalmente a la incubación de los cortes histológicos con los anticuerpos primarios durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, se lavaron los cortes con PBS al menos 4 veces durante 5 minutos, y se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios. Posteriormente, se lavaron y se dejaron en PBS hasta montar los cortes para su posterior observación al microscopio. Se montaron en portaobjetos con una solución de montaje protectora de fluorescencia. Para la observación, se usó un microscopio de epifluorescencia, con el que se obtendrían fotografías para su posterior análisis. Para el análisis, se empleó el programa ImageJ. A continuación, se detallan los anticuerpos primarios y secundarios:

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Origen</b>	<b>Características del antígeno</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
Anti-BrdU	Monoclonal de ratón	Identifica núcleos proliferantes	1:100	DAKO
Anti-Iba1	Policlonal de conejo	Identifica microglía	1:1000	Sigma Aldrich

<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Casa comercial</b>
Anti-IgG de ratón	Burro	1:1000	Alexa FLuor 488	Invitrogen
Anti-IgG de conejo	Burro	1:1000	Alexa Fluor 594	Invitrogen

## 5. Análisis estadístico

### 5.1 Grupos experimentales

Grupo 1: se lesionó la corteza cerebral de 10 ratones adultos, se implantaron minibombas osmóticas únicamente con vehículo y se analizaron mediante inmunohistoquímica 14 días después de la lesión.

Grupo 2: se lesionó la corteza cerebral de 10 ratones adultos, se implantaron minibombas osmóticas con el fármaco GM6001 (50  $\mu$ M) y se analizaron mediante inmunohistoquímica 14 días después de la lesión.

Tanto el grupo 1 como el 2 recibieron 3 inyecciones de BrdU el día 14 en intervalos de 2 horas y fueron sacrificados para su posterior análisis al menos 2 horas después de la última inyección.



## **5.2 Muestras**

De cada cerebro completo se realizaron cortes seriados y se eligieron los correspondientes a la región del cerebro que contenía la lesión. De estas secciones, se seleccionaron aquellas que contenían la lesión, desde la más caudal a la más rostral, de forma que la muestra fuese representativa de toda el área de la lesión.

## **5.3 Variables experimentales, grupos y condiciones experimentales**

Las variables que se estudiaron fueron:

1. Número de células proliferantes (BrdU<sup>+</sup>), tanto en las lesiones del grupo control como en las que han recibido tratamiento.
2. Número de microglía proliferante (Iba1<sup>+</sup>), tanto en lesiones del grupo control como en las que han recibido tratamiento.
3. Número de células dobles positivas (BrdU<sup>+</sup> /Iba1<sup>+</sup>), tanto en el grupo control como en las que han recibido tratamiento.

De este modo, las variables dependientes son el número de células BrdU<sup>+</sup>, el número de microglía proliferante Iba1<sup>+</sup> y el número de células doble positivas BrdU<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>. Para cada una de estas variables hay varias variables independientes, a saber:

1. Presencia de lesión.
2. Ausencia de lesión
3. Tratamiento con vehículo
4. Tratamiento con GM6001.

## **5.4 Análisis**

Los datos fueron almacenados en una base de datos de Excel y analizados mediante el programa IBM SPSS Statistics 22.

Se compararon siempre las variables dependientes en función de dos variables: presencia vs ausencia de lesión o tratamiento con vehículo vs tratamiento con GM6001. Las comparaciones entre las dos variables para cada parámetro se establecieron mediante comparación entre las medias realizadas con t-Student. La bondad del ajuste se analizó previamente mediante la prueba de contraste de Kolmogorov-Smirnov.

Valores inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

### **5.5 Limitaciones del estudio**

Se puede considerar una limitación del estudio la extrapolación a humanos, ya que estamos utilizando modelos experimentales en animales.

Una de las limitaciones del estudio es el uso del inhibidor general de metaloproteasas, si bien en nuestro laboratorio se ha demostrado que es ADAM17 el mayor responsable en la cadena de activación ADAM17/TGF $\alpha$ /EGFR y, por consiguiente, de la activación glial. Se ha demostrado que ADAM17 es la única enzima de este grupo que tiene efectos en la supervivencia y diferenciación de precursores neuronales y en la supervivencia de células microgliales, desconociéndose los efectos que puedan tener los demás miembros de la familia ADAM en este ámbito.

Otra de las limitaciones del estudio es el escaso número de animales que se pretende emplear. Este número está calculado en función de trabajos anteriores en los que se han realizado análisis similares y está aprobado por el Comité Ético de experimentación animal. La escasa variabilidad entre este tipo de muestras permite obtener normalidad con un número pequeño de animales. No obstante, sabemos que es una de las limitaciones de este tipo de estudios y trabajamos con el objetivo de cumplir con las denominadas “3 erres” de la experimentación animal (20):

- Reducir el número de animales.
- Reemplazar métodos que supongan el uso de animales por otros sin animales siempre que el resultado sea igual.
- Refinar los métodos para aliviar y evitar el sufrimiento de los animales de experimentación.

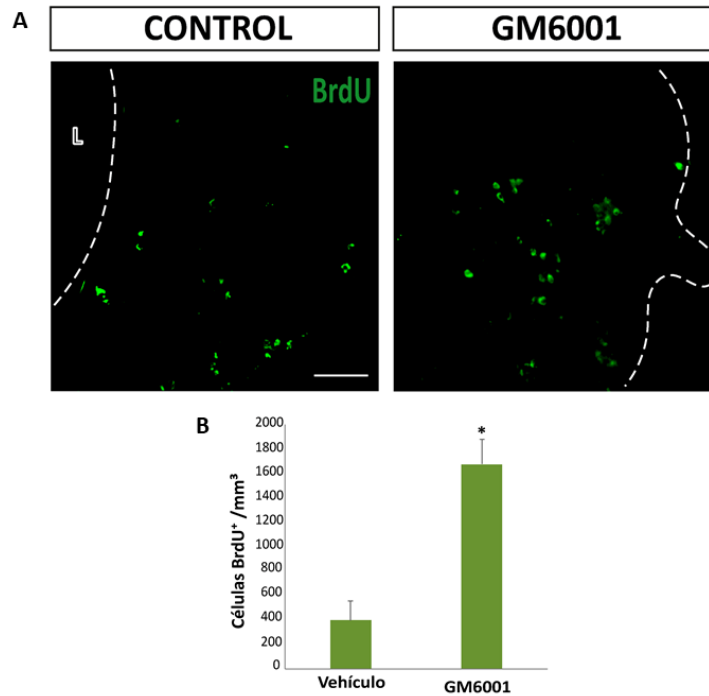
Sin embargo, existen diversos artículos que establecen el mínimo número necesario de animales requeridos para que el tamaño muestral sea representativo (27–29).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 La infusión local de un inhibidor general de metaloproteasas (GM6001) genera un incremento de células proliferantes en el área lesionada.**

Con el fin de estudiar la participación de la inhibición las metaloproteasas sobre la proliferación celular tras un daño traumático, se realizaron lesiones cerebrales traumáticas ipsilaterales (lado derecho) en la corteza motora primaria (M1). Para estudiar los mecanismos de proliferación, se utilizó el marcador BrdU (un análogo de timidina que se une a las células que entran en división en el momento de la inyección del mismo).

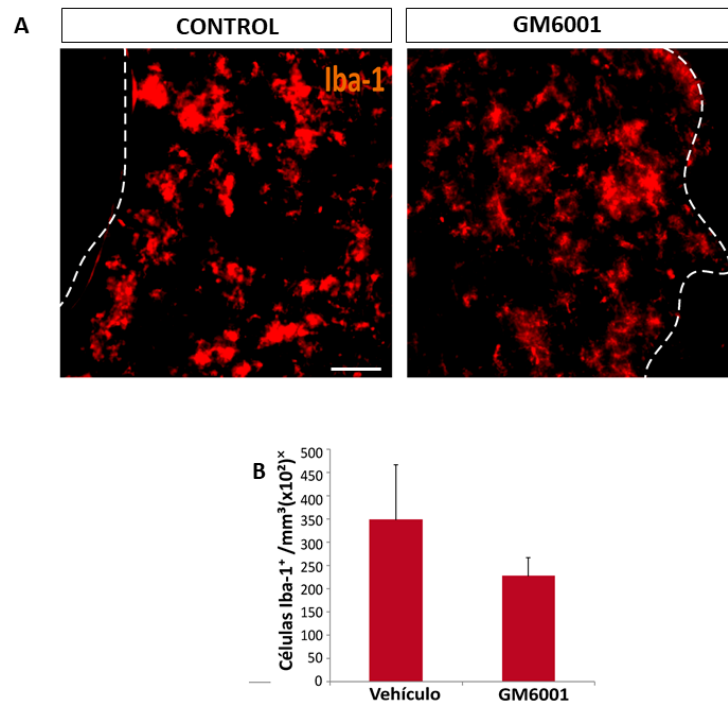
Como puede verse en la figura 9, el tratamiento con GM6001 (50  $\mu$ M) durante 14 días, aumentaba el número de células proliferantes en el perímetro de la lesión en los animales tratados en comparación con los infundidos únicamente con vehículo. Este resultado sugiere que el tratamiento local con GM6001 podría estar facilitando la supervivencia de las células proliferantes o bien activando mecanismos que promuevan una mayor proliferación o, incluso, la migración de precursores desde zonas neurogénicas (Figura 6).



**Figura 9: La inhibición general de metaloproteasas incrementa el número de células proliferantes en la lesión. A.** Las microfotografías muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de secciones coronales de corteza cerebral de ratones adultos lesionados mecánicamente en la corteza motora primaria. Las secciones se procesaron mediante técnicas inmunohistoquímicas para observar el marcador de proliferación celular BrdU. Las líneas de puntos señalan el límite de la lesión (L). **B.** El gráfico indica el número de células positivas para BrdU por mm<sup>3</sup> de lesión, observándose un aumento significativo de la presencia de células BrdU<sup>+</sup> en el área dañada de los animales tratados mediante GM6001 tras 14 días de tratamiento. La barra de calibración indica 100  $\mu$ m.

## **7.2 El tratamiento con GM6001 no afecta la proliferación de células de microglía.**

Con el fin de determinar si el aumento de células BrdU<sup>+</sup> obtenidas en presencia de GM6001 se debía a una respuesta inflamatoria y a un incremento en el número de células microgiales, se procedió a realizar una inmunohistoquímica con iba-1, que es una proteína EF-hand 17-kDA presente en los macrófagos y en la microglía que se sobreexpresa tras lesiones tisulares en el SNC, isquemia y en algunas enfermedades cerebrales. Observamos que en las lesiones tanto de animales control como de animales tratados, el número de células Iba1<sup>+</sup> no varía; esto quiere decir que la infusión local del inhibidor general de metaloproteasas no afecta al número de células de microglía presentes en la lesión, sugiriendo que este tratamiento no afecta de forma local a la respuesta inflamatoria generada por la lesión. Esto indica que este tratamiento no genera un incremento de la inflamación, aunque tampoco lo inhibe. Sería interesante estudiar la morfología de estas células de microglía para así realizar una comparación de activación de este tipo de células.

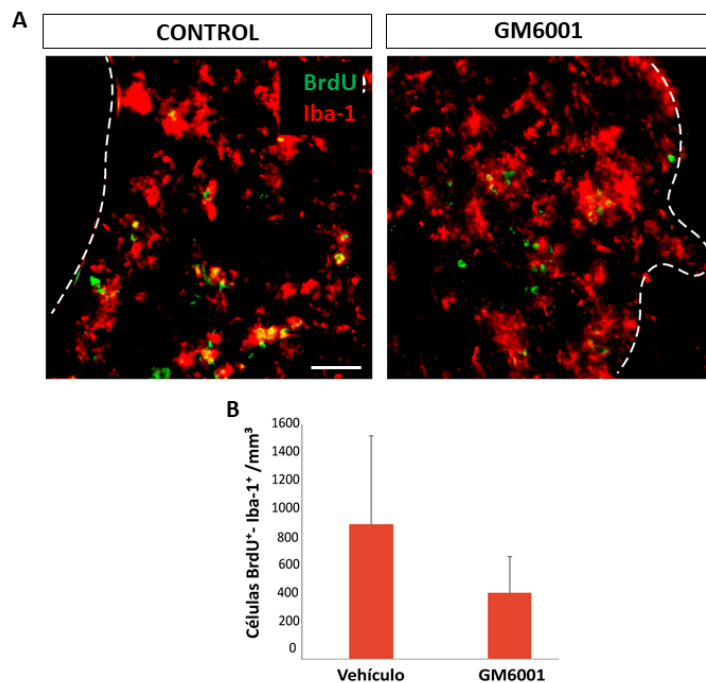


**figura 10: Formación de células microgliales tras una lesión mecánica en la corteza cerebral de ratón adulto.** **A.** Las microfotografías muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de secciones coronales de corteza cerebral de ratón adulto, previamente lesionada. Las secciones se procesaron para la detección inmunohistoquímica de células iba-1<sup>+</sup>. La línea de puntos señala el límite de la lesión (L) y la barra de error indica 100  $\mu$ m. **B.** El gráfico representa el número de células positivas para iba-1 en ambos grupos experimentales por mm<sup>3</sup>. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

### **7.3 La infusión local de GM6001 no afecta al número de microglías proliferantes.**

Con el propósito de estudiar si, efectivamente, el aumento del número de células proliferantes se debía a un incremento en el número de células de microglía en el área dañada, se midió el número de células proliferantes (BrdU<sup>+</sup>) que expresaban el marcador de microglía Iba1 en los dos grupos experimentales. Se procedió a realizar una inmunohistoquímica doble para células BrdU<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>, es decir que co-expresen estos dos marcadores a la vez. Observamos que no existe diferencias significativas de estas células en el área dañada de los ratones tratados con el inhibidor general de metaloproteasas durante los 14 días de tratamiento. Al observar un aumento en el número de células proliferantes que, fenotípicamente no son microglías y, por tanto, no se corresponden con células del sistema inmune, podría estar indicando que pueden estimularse otro fenotipo celular, por ejemplo, precursores indiferenciados, células gliales o bien nuevas neuronas.





**Figura 11: Proliferación de células microgliales tras una lesión mecánica en la corteza cerebral de ratón adulto.** **A.** Las microfotografías muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de secciones coronales de corteza cerebral de ratones adultos lesionados mecánicamente en la corteza motora primaria. Las secciones se procesaron mediante técnicas inmunohistoquímicas para observar la doble expresión de los marcadores de proliferación celular (BrdU) y microglial (Iba-1). Las líneas de puntos señalan el límite de la lesión (L). **B.** El gráfico indica el número de células positivas para BrdU e Iba-1 por mm<sup>3</sup> de lesión. No se observan disminuciones significativas de la presencia de microglía en el área dañada de los animales tratados mediante GM6001 tras 14 días de tratamiento.

## 8. Discusión

Actualmente, no existe un tratamiento efectivo para la regeneración de lesiones cerebrales. Desde los primeros estudios que muestran proliferación celular tras lesiones de la corteza cerebral (30) o en la médula espinal (31–33), se han publicado varios trabajos realizados *in vivo* en los que se analiza la neurogénesis en respuesta a lesiones traumáticas. La mayoría de estos estudios se han centrado en la neurogénesis en las regiones fisiológicamente neurogénicas (32–34) y pocos describen lo que ocurre en el perímetro de una lesión en la corteza cerebral (24,35–37).

Un estudio reciente demuestra que en el tejido cerebral lesionado se activan NSC capaces de producir NPC que, posteriormente, van a diferenciarse (4). La zona lesionada constituye un ambiente gliogénico en el que estos precursores se diferencian a células gliales y no a neuronas (19). Sin embargo, es difícil comparar ensayos realizados en lesiones cerebrales, pues cada uno de ellos emplea un modelo diferente de lesión, un patrón específico de administración del marcador de proliferación BrdU y una especie animal diferente.

En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un tipo de lesión cortical controlada que afecta la corteza motora primaria (M1) de ratones adultos. Utilizando este tipo de lesiones, hemos comprobado que aparecen células proliferantes desde el día 3 después de la lesión y alcanza su máximo en el día 7 para disminuir drásticamente entre los días 7 y 14 (38). Estas células proliferantes son principalmente precursores indiferenciados (nestina<sup>+</sup>) que, a partir del día 14 post lesión, comienzan a diferenciarse a glioblastos (38), de manera que no se generan neuroblastos o nuevas neuronas en el perímetro de la lesión. Esta respuesta gliogénica de la lesión ha sido descrita también por otros grupos que demuestran que, en el entorno del tejido lesionado, el destino de estas células proliferantes se dirige a células de glía, contribuyendo a generar así una parte de la extensa cicatriz glial que abarca gran parte del contorno de la lesión (35). Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la vía ADAM17/TGF $\alpha$ /EGFR promueve la diferenciación glial *in vitro* y está activada en lesiones mecánicas cerebrales, en las que desempeña un papel gliogénico/no- neurogénico. Cuando se administra un inhibidor de la actividad tirosín-quinasa del EGFR o un inhibidor general de metaloproteasas (GM6001),

se consigue disminuir la diferenciación glial y aumentar el número de neuroblastos en cultivo (11).

La microglía son los macrófagos del SNC y derivan de los monocitos que invaden el SNC antes de la semana 8 del desarrollo embrionario, persistiendo durante la vida adulta como macrófagos residentes. Los precursores hematopoyéticos no contribuyen a la homeostasis microglial en el cerebro adulto (39).

Cuando se produce un daño cerebral traumático, se desencadena una respuesta inflamatoria caracterizada por una gliosis reactiva, proliferación de varias estirpes celulares y muerte celular en la zona pericontusional (11). La microglía es la población celular más proliferativa en los primeros 3 días post-lesión (11). Estas células reconocen ligeras variaciones en el microambiente local por medio de sus procesos celulares y responden a ellas, activándose ante un cambio homeostático o ante señales indicativas de daño cerebral y adquiriendo una forma ameboide típica, parecida a la de los macrófagos tisulares. Además, tienen la capacidad de segregar moléculas proinflamatorias que regulan el comportamiento de las células de la glía y contribuyen a la generación de un daño hístico secundario que disminuye la supervivencia neuronal por la liberación de citoquinas proinflamatorias y la liberación de sustancias neurotóxicas, como pueden ser las especies reactivas del oxígeno (21). Todos estos estudios nos empujaron a postular la hipótesis de que la inhibición de ADAM17 mediante un inhibidor general de metaloproteasas podría afectar a la respuesta microglial y, por consiguiente, al nicho gliogénico/no-neurogénico presente en las lesiones cerebrales de diferentes etiologías. Otros estudios indican que, tras inhibir ADAM17 con un inhibidor de metaloproteasas, denominado TAPI-2, se consigue aumentar de forma significativa la apoptosis de microglía y oligodendrocitos de forma dosis y tiempo - dependiente, y es resultado del aumento de expresión de caspasa 3 por la inhibición de ADAM17 (26). Se observó, a su vez, que la supervivencia celular dependiente de ADAM17 requería de la activación de EGFR/MAPK por los ligandos que éste escide de la superficie celular.

Además, otro dato que apoya la inhibición de TACE son los resultados obtenidos de muchos estudios, que demuestran que hay un incremento de citoquinas proinflamatorias (como TNF $\alpha$ ) en las horas que siguen al trauma (19,38). El TNF $\alpha$  se sintetiza como una proteína transmembrana tipo II (pro-TNF $\alpha$  o mTNF- $\alpha$ ), que se libera en su forma soluble después de sufrir una proteólisis en su porción transmembrana por ADAM17 (19,40). Se

ha descrito que el mTNF- $\alpha$  disminuye la inflamación, mientras que su forma soluble promueve respuestas inflamatorias. Una vez liberada de su porción transmembrana, la acción del TNF- $\alpha$  está mediada por medio de dos tipos de receptores: los TNFR1 y los TNFR2 en la microglía. La estimulación de estos receptores por el TNF $\alpha$  promueve la actividad microglial fagocítica, como mencionado anteriormente. Esto se ha demostrado por la reducción de la activación microglial en lesiones nerviosas del SNC de ratones transgénicos deficientes en receptores del TNF $\alpha$  (21). Además de la activación microglial, el aumento de TNF- $\alpha$  está ligado a apoptosis neuronal, aumento de la permeabilidad vascular y disminución del metabolismo del glutamato (21).

No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que no hay una disminución significativa de la respuesta microglial tras la administración del inhibidor general de metaloproteasas GM6001 durante 14 días, a pesar del incremento estadísticamente significativo de las células proliferantes en general. Este incremento ha sido descrito ya en nuestro laboratorio y se demostró que al inhibir de forma general a las metaloproteasas, existe un incremento de los neuroblastos en el contorno de la lesión (19), indicando un cambio en el nicho no neurogénico existente en la región perilesional. Esta cuestión puede explicarse debido a que nuestro estudio se realizó a los 14 días post-lesión, y siendo las microglías las primeras células en manifestarse (11), posiblemente el estudio se podría realizar en menos tiempo, por ejemplo, a los 3 o a los 7 días posteriores a la lesión.

Tras la administración del GM6001, según estudios anteriores de nuestro laboratorio, se indujo un aumento en las células proliferantes BrdU<sup>+</sup>, que coincidía en cantidad y tiempo con un aumento en el número de precursores indiferenciados, observándose, a los 14 días post-lesión, una disminución de los precursores gliales proliferantes y la aparición de neuroblastos (19). Estos resultados apoyan que las metaloproteasas, en específico ADAM17, promueven la diferenciación glial y su inhibición, bloquea este efecto. Sin embargo, al tratarse de un inhibidor general de metaloproteasas, no podemos asegurar cuál es la metaloproteasa responsable de estos efectos ni descartar cualquier otro mecanismo. En estudios posteriores, al inhibir ADAM17 específicamente a través de un lentivirus con un dominante negativo de ésta, se observó que existe una proliferación

masiva de células dirigidas a la estirpe neuronal (38). Una estrategia podría ser estudiar la formación microglial al inyectar este lentivirus de forma local en la lesión cortical, o bien estudiar la microglía dependiendo de su morfología para entender si, aunque el número de éstas no esté disminuido con el tratamiento con GM6001, la forma activada de la misma (con menos ramificaciones) esté disminuida.

En síntesis, estos resultados indican que la inhibición local de ADAM17 o de metaloproteasas no incrementa la respuesta inflamatoria y que, por tanto, este tipo de sustancias pueden constituir un tratamiento para fomentar el reemplazo neuronal en lesiones cerebrales que cursan con pérdida de neuronas.

## 9. Conclusiones

La inhibición general de metaloproteasas mediante un inhibidor general de metaloproteasas (GM6001) infundido de forma local incrementa de manera estadísticamente significativa el número de células proliferantes en el contorno lesionado.

La inhibición general de metaloproteasas mediante un inhibidor general de metaloproteasas (GM6001) no afecta la reacción microglial en el contorno de la lesión tras 14 días de tratamiento.

Existen células proliferantes a los 14 días que corresponden con un fenotipo microglial, aunque el aumento en el número de células proliferantes no se debe a un aumento en el número de células de microglía.

## 10. Bibliografía

1. Bulb O, Neurogenesis OB, Lim DA, Alvarez-buylla A. The Adult Ventricular – Subventricular Zone. 2016;1–34.
2. Emsley JG, Hagg T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. 2003;183:298–310.
3. Doetsch F, Garcı JM, Alvarez-buylla A. Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. 1997;17(13):5046–61.
4. Codega P, Silva-vargas V, Paul A, Maldonado-soto AR, Deleo AM, Pastrana E. Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. Neuron. 2014;82(3):545–59.
5. Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet M, et al. Doublecortin Is a Developmentally Regulated , Microtubule-Associated Protein Expressed in Migrating and Differentiating Neurons. 1999;23:247–56.
6. Garcia-verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the. 2006;26(30):7907–18.
7. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A. Noggin Antagonizes BMP Signaling to Create a Niche for Adult Neurogenesis. 2000;28:713–26.
8. Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. 2004;7(7):726–35.
9. Li Q, Qiao G, Ma J, Fan H, Li Y. Cortical neurogenesis in adult rats after ischemic brain injury : most new neurons fail to mature. 2015;10(2):277–85.
10. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. 2000;405(June):951–5.
11. Susarla BT, Villapol S, Yi JH, Geller HM, Symes AJ. Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice. ASN Neuro. 2014;6(3):159–70.

12. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. 1999;49(6):377–91.
13. Tan AM, Zhang W, Levine JM. NG2 : a component of the glial scar that inhibits axon growth. 2005;717–25.
14. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, et al. Leukocyte Infiltration , Neuronal Degeneration , and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming , Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. 1999;23:297–308.
15. Silver J, Miller JH. REGENERATION BEYOND THE GLIAL SCAR. 2004;5 (February):146–56.
16. Properzi F, Carulli D, Asher RA, Muir E, Camargo LM, Kuppevelt TH Van, et al. Chondroitin 6-sulphate synthesis is up-regulated in injured CNS , induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia. 2005;21 (November 2004):378–90.
17. Fawcett JW. INHIBITING CELL PROLIFERATION DURING FORMATION OF THE GLIAL SCAR : EFFECTS ON AXON REGENERATION IN THE CNS. 2003;120:41–56.
18. Giebler N, Zigrino P. A disintegrin and metalloprotease (ADAM): Historical overview of their functions. Toxins (Basel). 2016;8(4).
19. Romero-Grimaldi C, Murillo-Carretero M, López-Toledano MA, Carrasco M, Castro C, Estrada C. ADAM-17/tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme inhibits neurogenesis and promotes gliogenesis from neural stem cells. Stem Cells. 2011;29(10):1628–39.
20. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. Physiol Rev. 2011;91(2):461–553.
21. Fernandes A, Miller-Fleming L, Pais TF. Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control? Cell Mol Life Sci. 2014;71(20):3969–85.
22. Vidal PM, Lemmens E, Avila A, Vangansewinkel T, Chalaris A, Rose-John S, et al. ADAM17 is a survival factor for microglial cells in vitro and in vivo after spinal cord injury in mice. Cell Death Dis. 2013;4(12)
23. Zheng X, Jiang F, Katakowski M, Lu Y, Chopp M. ADAM17 promotes glioma cell malignant phenotype. Mol Carcinog. 2012;51(2):150–64.
24. Saftig P, Khokha R, Lundell D, Blobel CP. Its Catalytic Site. Clin Res.



25. Qu W, Tian D, Guo Z, Fang J, Zhang Q, Yu Z, et al. Inhibition of EGFR / MAPK signaling reduces microglial inflammatory response and the associated secondary damage in rats after spinal cord injury. 2012;1–14.
26. Wei Z, Yu D, Bi Y, Cao Y. A disintegrin and metalloprotease 17 promotes microglial cell survival via epidermal growth factor receptor signalling following spinal cord injury. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):63–70.
27. Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SPA, Giembycz MA, et al. Experimental design and analysis and their reporting : new guidance for publication in BJP. 2015;3461–71.
28. Mcgrath JC, Mclachlan EM, Zeller R. Transparency in Research involving Animals : The Basel Declaration and new principles for reporting research in BJP manuscripts. 2015;(2013):2427–32.
29. Mcgrath JC, Drummond GB, Mclachlan EM, Kilkenny C. Guidelines for reporting experiments involving animals : the ARRIVE. 2010;(2009).
30. Cavanagh JB, Neurobiology A. The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. 1970;471–87.
31. Adrian, E.K., Jr., y Walker, B.E. (1962). Incorporation of thymidine-H3 by cells in normal and injured mouse spinal cord. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 21, 597-609.
32. Dash, P.K., Mach, S.A., y Moore, A.N. (2001). Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 63, 313-319.
33. Rice, A.C., Khaldi, A., Harvey, H.B., Salman, N.J., White, F., Fillmore, H., y Bullock, M.R. (2003). Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 183, 406-417.
34. Chirumamilla S, Sun D, Bullock MR, Colello RJ. Traumatic Brain Injury Induced Cell Proliferation in the Adult Mammalian Central Nervous System. 2002;19(6):693–703.
35. Alonso, G. (2005). NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound. *Glia* 49, 318-338.

36. Kernie, S.G., Erwin, T.M., y Parada, L.F. (2001). Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. *J Neurosci Res.* 66, 317-326.
37. Itoh, T., Imano, M., Nishida, S., Tsubaki, M., Hashimoto, S., Ito, A., y Satou, T. (2011). Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury. *J Neural Transm* 118, 193-202.
38. Noelia Geribaldi-Doldán, Manuel Carrasco Viñuela, Maribel Murillo-Carretero, Samuel Domínguez, Francisco J. García-Cózar, Juan Pedro Muñoz-Miranda, Vaime del Río-García, Cristina Verástegui and Carmen Castro. Specific inhibition of ADAM17/TACE promotes neurogenesis in the injured motor cortex. *Cell Death and Disease*. In press.
39. Gomes-leal W. Microglial physiopathology : how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? 2012;345–56.
40. Matthews AL, Noy PJ, Reyat JS, Tomlinson MG. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets*. 2016;7104(July):1–9.